

Efek Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dengan Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol dan Kotrimoksazol terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Ira Adelia Putri, Rio Risadiansyah, Faisal
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
Email: iraadelptr@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Antibiotics are the drugs most commonly used in therapy, since infections are among the ten most common diseases. However, antibiotics also contribute significantly to the development of resistance, which makes treatment more difficult. The effort to overcome this is by combining antibiotics with herb such as meniran. The purpose of this study is to determine the changes of Zone of Inhibition (ZOI), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of amoxicillin (AMX), chloramphenicol (CHL), and co-trimoxazole (CTX) after combination with meniran.

Methods: This study was an *in vitro* laboratory experiments. ZOI was tested by modified AZDAST method using wells instead of disk and was interpreted by measuring the diameter of the open area around the well. MIC was tested by the macrodilution method using a test tube containing antibiotics, extract, nutrient broth and bacteria. Interpret the results by comparing the clearness and presence of sediments. MBC is a continuation of KHM by examining the bacterial growth of each dilution on an agar medium.

Results: The combination of meniran with AMX, CHL and CTX in the ZOI test for *E.coli* increased significantly compared to the single test, as well as *S.aureus* for CHL and CTX. The FICI combined meniran with CHL and CTX against both bacteria, which resulted in an additive interaction. Meniran with AMX against *E.coli* is antagonistic while in *S.aureus* it is synergistic. The results of FBCI values of meniran with AMX and CTX in *S.aureus* were synergistic and the combination of meniran with CHL against *E.coli* was additive.

Conclusion: Loading with AMX against *E.coli* in different tests provides synergistic and antagonistic results. The combination of meniran with CHL and CTX against *S.aureus* and CHL with meniran of *E.coli* is bactericidal, but in other combinations it can not be evaluated due to MBC results outside the test dose.

Keywords: ZOI, MIC, MBC, amoxicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, meniran, combinations of herbal antibiotics.

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan obat yang paling sering digunakan sebagai terapi, dan merupakan penggunaan anggaran terbesar dari beberapa rumah sakit¹. Hal ini terjadi karena di Indonesia infeksi menduduki sepuluh besar penyakit terbanyak, sehingga penggunaan antibiotik menjadi sangat tinggi². Namun, antibiotik juga berkontribusi besar terhadap terjadinya resistensi. Resistensi antibiotik merupakan suatu kondisi dimana terjadi perubahan respon dari bakteri terhadap antibiotik³. Menurut *World Health Organization* (WHO) 2009, Indonesia berada diposisi ke-8 dari 27 negara dengan beban tinggi *Multidrug Resistance* (MDR), sehingga hal tersebut berdampak pada meningkatnya biaya yang dikeluarkan karena infeksi bakteri⁴. Resistensi dapat terjadi karena beberapa hal antara lain mutasi bakteri, penggunaan obat yang tidak sesuai dosis, tidak sesuai penyakit dan tidak sesuai dengan jangka waktu⁵.

Beberapa bakteri yang dapat mengalami resistensi antara lain *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kedua bakteri ini resisten terhadap antibiotik dari berbagai golongan dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda. Bentuk resistensi dari bakteri tersebut disebut sebagai *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL)^{6,7}. Solusi untuk menanggulangi resistensi antibiotik, adalah dengan melakukan kombinasi antibiotik dengan herbal yang memiliki aktifitas antibakteri sebagai terapi adjuvan, dengan harapan antibiotik yang telah mengalami resistensi dapat menjadi lebih efektif.

Kombinasi yang telah dilakukan pada dua bahan coba yang berbeda yaitu antara antibiotik dengan antibiotik. Penelitian yang dilakukan Ahmed *et al* (2013), mengenai efek daya hambat kombinasi *cefadroxil* dengan *amoxicillin* terhadap *S. aureus* menunjukkan hasil yang sinergis, dikatakan sinergis karena memiliki hasil (FIC index 0,14 – 0,50) dalam uji kadar hambat minimumnya⁸. Sedangkan, kombinasi herbal antibiotik berkenaan dengan peningkatan aktivitas antibiotik telah dilakukan sebelumnya oleh Yu *et al* (2005), mengenai kombinasi senyawa *barberine* dari 2 tanaman yang diuji yaitu, *Coptidiz rhizome* dan *Phellodendri cortex* dengan *ampicillin* bernilai sinergis, hal ini terjadi karena diameter ZOI dari kombinasi tersebut lebih besar dibandingkan dengan uji tunggalnya, sehingga dari penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi dari antibiotik dan herbal lebih efektif dibandingkan uji tunggalnya⁹.

Tanaman herbal lain yang memiliki aktifitas antibakteri salah satunya adalah meniran (*Phyllanthus niruri*)¹⁰. Penelitian mengenai daya hambat meniran terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* telah dilakukan Ibrahim *et al* (2013), uji dilakukan menggunakan ekstrak metanol meniran dengan konsentrasi 100

mg/ml. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa meniran dapat menghambat *E. coli* sebesar 8 mm dan *S. aureus* sebesar 15 mm, sehingga hal tersebut menunjukkan bahwa meniran memiliki aktifitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*¹¹. Pada ekstrak etanol meniran diketahui memiliki senyawa aktif seperti alkaloid (sekurin), flavonoid (kuersetin, kuersitrin, isokuersitrin, astargalin, nirurin, niruside, rutin, leukodelfinidin dan galokatekin) dan lignin (filantin dan hipofilantin)¹².

Sampai saat ini belum ada penelitian yang melibatkan interaksi antara meniran dengan antibiotik dan belum diketahui apakah meniran akan aman bila dikonsumsi bersamaan dengan antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat dari amoksisilin, kloramfenikol dan kotrimoksazol dan meniran secara tunggal maupun kombinasi terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan April-Agustus 2018.

Pembuatan Ekstrak Metanol Meniran

Prosedur pembuatan ekstrak metanol meniran diawali dengan mempersiapkan simplisia kasar yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) yang kemudian melewati proses penggilingan di Balai Materi Medika Batu menjadi simplisia halus. Pertama, simplisia ditimbang sebanyak 20 g dan dilarutkan dengan pelarut metanol 96% sebanyak 200 ml dalam erlenmeyer. Larutan didiamkan selama 18-24 jam dalam *shaker water bath* dengan pengaturan alat 4. Hasil dari ekstrak disaring dengan corong *buchner* dalam keadaan vakum dan dilapisi 3 lapis kertas saring untuk memperoleh filtrat yang kemudian dievaporasi sampai mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang telah kental disuspensikan 100 mg/ml menggunakan metanol absolut. Hasil ekstrak tersebut disimpan dalam 1,5 ml *microtube* dan diletakkan dikulkas sampai akan digunakan.

Pembuatan Larutan Antibiotik Amoksisilin (AMX)

Pembuatan larutan amoksisilin Phapros® dengan Reg. No. GKL0319231344A1 dimulai dengan mempersiapkan serbuk vial *amoxicillin* 1500 mg, serbuk vial tersebut dilarutkan dengan aquadest steril untuk mencapai konsentrasi 1 mg/ml. Larutan tersebut disimpan didalam kulkas 4°C.

Kloramfenikol (CHL)

Pembuatan larutan kloramfenikol Indofarm® Reg. No.GKL9420906501A1 dimulai dengan mempersiapkan 1 buah kapsul kloramfenikol yang berisi 500 mg, serbuk dari kapsul dilarutkan dengan aquadest steril untuk mencapai konsentrasi 1 mg/ml. Larutan tersebut disimpan dalam kulkas 4°C.

Kotrimoksazol (CTX)

Pembuatan larutan kotrimoksazol Bernofarm® dengan No. Reg. GKL9402320210A1 dimulai dengan mempersiapkan 1 buah tablet *co-trimoxazole* yang berisi 480 mg, tablet di tumbuk sampai berbentuk serbuk halus yang kemudian dilarutkan dengan aquadest steril untuk mencapai konsentrasi 1 mg/ml. Larutan tersebut disimpan dalam kulkas 4°C.

Persiapan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* strain klinis yang didapatkan dari Laboratorium Terpadu Universitas Islam Malang. Bakteri tersebut dibiakkan pada media *Nutrient agar* (NA) selama $\pm 18-24$ jam. Pembuatan suspensi dilanjutkan dengan metode *McFarland test* untuk mendapatkan suspensi bakteri 10^8 CFU/ml, yang kemudian diambil 1 ml dan ditambahkan 9 ml NaCl untuk mendapatkan suspensi bakteri 10^7 CFU/ml.

Zone of Inhibition (ZOI)

ZOI merupakan suatu uji yang dilakukan untuk melihat efektifitas dari bahan coba dalam menghambat mikroorganisme¹³. Suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan untuk ZOI adalah bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/ml. Bakteri tersebut di *swab* diatas *petri dish* yang telah berisi agar. Metode yang digunakan dalam uji ZOI kombinasi adalah *AZDAST* yang dimodifikasi dengan sumuran dan metode *Kirby-bauer* sumuran untuk uji tunggal^{13,14}. *Petri dish* yang telah berisi bakteri dilubangi dengan *cork borer* dengan diameter ± 6 mm. Antibiotik dan meniran diencerkan dalam beberapa konsentrasi yang berbeda dengan konsentrasi induk antibiotik 0,5 mg/ml, meniran terhadap *E.coli* 2 mg/ml dan meniran terhadap *S.aureus* 1 mg/ml. Hasil pengenceran tersebut masing-masing dimasukkan dalam setiap lubang sumuran sebanyak 30 μ l untuk uji tunggal, dan perbandingan 1:1 dengan total 30 μ l untuk uji kombinasi.

Uji ZOI kombinasi antibiotik dengan meniran menggunakan 2 dosis berbeda dari tiap bahan cobanya, dosis pertama yaitu antibiotik dosis rendah (ADR) dan herbal dosis rendah (HDR) merupakan dosis ZOI tunggal dengan diameter <10 mm, sedangkan antibiotik dosis tinggi (ADT) dan herbal dosis tinggi (HDT) adalah 8 kali lebih tinggi dari dosis ADR dan HDR.

Dosis antibiotik dan herbal yang digunakan dalam uji ZOI kombinasi terhadap *E.coli* adalah sebagai berikut, AMX dengan ADR 0,03 mg/ml dan ADT 0,25 mg/ml, CHL dengan ADR 0,01 mg/ml dan ADT 0,125 mg/ml, CTX dengan ADR 0,03 mg/ml dan ADT 0,25 mg/ml, sedangkan untuk meniran HDR 1 mg/ml dan HDT 2 mg/ml.

Dosis antibiotik dan herbal yang digunakan dalam uji ZOI kombinasi terhadap *S.aureus* adalah sebagai berikut, AMX dengan ADR 0,01 mg/ml dan ADT 0,125 mg/ml, CHL dengan ADR 0,007 mg/ml dan ADT 0,06 mg/ml, CTX dengan ADR 0,03 mg/ml dan ADT 0,125 mg/ml, sedangkan untuk herbal HDR 0,003 mg/ml dan HDT 0,125 mg/ml.

ZOI kombinasi dievaluasi dengan melihat interaksinya dari tiap kombinasi. Dikatakan sinergis apabila ADT/R+HDT/R lebih besar dari ADT/R dan HDT/R dan lebih kecil atau lebih besar dari ADT/R+ADT/R atau HDT/R+HDT/R. Dikatakan aditif apabila ADT/R+HDT/R sama dengan ADT/R+ADT/R atau HDT/R+HDT/R. Dikatakan antagonis jika ADT/R+HDT/R lebih kecil dari ADT/R+HDT/R.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Kadar hambat minimum merupakan konsentrasi terkecil yang dibutuhkan suatu bahan untuk menghambat mikroorganisme¹⁵. Pada uji KHM, bakteri yang digunakan adalah bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dengan suspensi 10^7 CFU/ml, kemudian beberapa konsentrasi antibiotik dan meniran disiapkan dari konsentrasi induk antibiotik dan herbal 0,5 mg/ml. Uji KHM dilakukan secara tunggal dan kombinasi dengan metode mikrodilusi dan makrodilusi. Mikrodilusi dilakukan dengan 96-well plate untuk uji tunggal antibiotik, Metode makrodilusi digunakan menggunakan 24 tabung reaksi untuk menguji meniran tunggal dan kombinasi dengan antibiotik.

Hasil KHM mikrodilusi dievaluasi menggunakan EPOCH dengan program GEN 5™, sedangkan KHM makrodilusi secara visual dengan melihat kejernihan atau ada tidaknya endapan didasar tabung. Setiap lubang berisi cairan 200 μ l pada mikrodilusi dan 2 ml pada makrodilusi, yang mana pada uji KHM tunggal berisi meniran, *Nutrient broth* dan suspensi bakteri 10^7 CFU/ml dengan perbandingan 2:1:1, sedangkan uji KHM kombinasi berisikan antibiotik, meniran, NB dan suspensi bakteri 10^7 CFU/ml dengan perbandingan 1:1:1:1. Kontrol negatif berisi 2 ml aquadest, media cair *Nutrient broth* dan NaCl dengan perbandingan 2:1:1, dan kontrol positif terdiri dari aquadest, *Nutrient broth* dan bakteri 10^7 CFU/ml dengan perbandingan 2:1:1. Selanjutnya, tabung reaksi yang telah terisi diinkubasi selama $\pm 18-24$ jam dan dilakukan pengamatan adanya kejernihan atau endapan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum.

Hasil KHM kombinasi dievaluasi menggunakan *Checkerboard Assay* dengan rumus:

$$\sum FICI = \frac{MIC_{combination\ a}}{MIC_{alone\ a}} + \frac{MIC_{combination\ b}}{MIC_{alone\ b}}$$

Rumus diatas digunakan untuk melihat interaksi dari kombinasi dua bahan yang berbeda. Minimum Inhibition Concentration (MIC) pada rumus sama seperti KHM. Apabila hasil penghitungan bernilai $\leq 0,5$ maka kombinasi bersifat sinergis, Sinergis adalah interaksi positif dimana efek kombinasi secara signifikan lebih besar dari hasil tunggal. Nilai antara 0,5–4 kombinasi bersifat aditif, yang mana aditif adalah apabila jumlah dari dua hasil senyawa sama dengan hasil kombinasinya, dan apabila >4 kombinasi bernilai antagonis, yang mana dapat dikatakan antagonis apabila hasil kombinasi menghasilkan interaksi yang negatif^{16,17}.

Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Uji Kadar Bunuh Minimum (KBM) dilakukan untuk melihat konsentrasi terkecil dari antibakteri yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri¹⁸. Uji KBM dilakukan dengan menyiapkan *petri dish* yang telah digambar kotak-kotak dengan ukuran 1,5 x 1,5 cm. *Petri dish* diisi dengan NA dan ditunggu sampai memadat, setelah itu diteteskan 10 μ l dari tiap tabung reaksi pada KHM. KBM yang telah dibuat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil KBM kombinasi dievaluasi dengan melihat ada tidaknya bakteri yang tumbuh dari tiap kotaknya.

Kombinasi dari KBM dapat dievaluasi menggunakan *Checkerboard Assay* dengan rumus:

$$\sum FBCI = \frac{MBC_{combination\ a}}{MBC_{alone\ a}} + \frac{MBC_{combination\ b}}{MBC_{alone\ b}}$$

Evaluasi hasil FBC menggunakan standar yang sama dengan standar pada FIC. Bersifat sinergis apabila hasil $\leq 0,5$, aditif bila kombinasi bernilai 0,5-4, dan bersifat antagonis bila perhitungan bernilai >4 ¹⁶.

Analisa Data Statistik

Pembacaan hasil ZOI kombinasi dan tunggal dilakukan menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm dan dibuat menggunakan *Microsoft Excel 2010* untuk mendapatkan rerata dan standar deviasi. Uji Statistik normalitas distribusi menggunakan *Kolmogrov-Smirnov*, karena data menunjukkan tidak terdistribusi normal ($p > 0,5$), maka uji dilanjutkan menggunakan uji non-parametric yaitu *Mann-Whitney*. Perbandingan dilakukan antara ADT+HDT dengan ADT+ADT, HDT+HDT, ADT dan HDT. ADR+HDR dengan ADR+ADT, HDR+HDR, ADR dan HDR. Analisa hasil KHM tunggal antibiotik dilakukan menggunakan Spektrofotometer EPOCH dengan program GEN 5™, kemudian KHM dan KBM kombinasi diinterpretasi dengan FIC dan FBC indeks untuk melihat interaksi antar kombinasi.

HASIL

Hasil Zone of Inhibition Tunggal

Hasil pengukuran dari antibiotik dan ekstrak meniran terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* secara tunggal dalam beberapa pengenceran dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2, sedangkan contoh uji ZOI tunggal meniran ditunjukkan gambar 1.

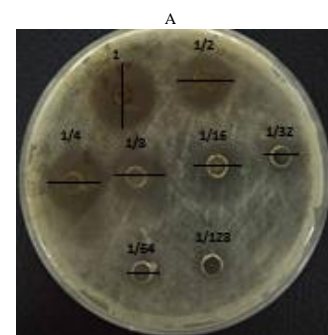
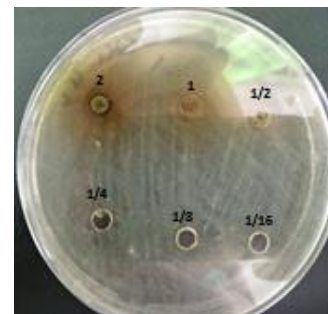
Tabel 1, Rerata Hasil Pengukuran ZOI Meniran Tunggal terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

| Pengenceran | Dosis (mg/ml) | Diameter ZOI (mm) | |
|-------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| | | <i>E.coli</i> n = 3 | <i>S.aureus</i> n = 3 |
| 2 | 2 | 0 | - |
| 1 | 1 | 0 | 20,3 \pm 3,21 |
| 1/2 | 0,5 | 0 | 17 \pm 1,73 |
| 1/4 | 0,25 | 0 | 14,6 \pm 1,15 |
| 1/8 | 0,125 | 0 | 12 \pm 1,73 |
| 1/16 | 0,06 | 0 | 10,6 \pm 1,15 |
| 1/32 | 0,03 | 0 | 8,6 \pm 1,15 |
| 1/64 | 0,01 | 0 | 6,3 \pm 0,58 |
| 1/128 | 0,007 | - | 0 |

Keterangan:

10-22 mm : daya hambat kuat; 5-10 mm : daya hambat sedang; <6 mm : daya hambat lemah

Berdasarkan tabel diatas, ZOI tidak terlihat pada ekstrak meniran terhadap *E.coli*, sedangkan pada *S.aureus* ZOI didapatkan nilai rerata \pm SD sebesar 20,3 \pm 3,21 mm pada konsentrasi ekstrak 1 mg/ml dan ZOI menghilang pada meniran terhadap *S.aureus* pada konsentrasi 0,007 mg/ml atau pada pengenceran 1/128.



Keterangan:

Gambar 1. A. ZOI ekstrak meniran terhadap *E.coli* tidak menunjukkan adanya zona hambat. Gambar B. ZOI ekstrak meniran terhadap *S.aureus* menunjukkan semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona beningnya.

Tabel 2. Rerata Hasil Pengukuran ZOI Antibiotik Tunggal terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

| Pengenceran | Dosis (mg/ml) | Diameter ZOI (mm) | | | | | |
|-------------|------------------|------------------------|--------------|--------------|------------------------------|--------------|--------------|
| | | <i>Eschericia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| | | AMX n = 3 | CHL n = 3 | CTX n = 3 | AMX n = 3 | CHL n = 3 | CTX n = 3 |
| 1/2 | 0,5 | 17,3±1,52 | 34,6±1,15 | 20,6±0,57 | 21,6±1,53 | 32,6±1,15 | 25±3 |
| 1/4 | 0,25 | 15,6±1,15 | 28 ±3,46 | 16,3±0,57 | 19,3±1,53 | 30±0 | 19,3±1,53 |
| 1/8 | 0,125 | 12,6±1,15 | 24±2 | 14,3±0,57 | 16,6±1,53 | 24,6±2,31 | 15,6±2,1 |
| 1/16 | 0,06 | 10,6±1,15 | 16,3±4,72 | 12±1 | 14±2 | 20±0 | 12±1 |
| 1/32 | 0,03 | 0 | 12 ±3,46 | 0 | 10,3±2,1 | 14,6±1,15 | 0 |
| 1/64 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 5,3 ±5,03 | 11,6±0,58 | 0 |
| 1/128 | 0,007 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/256 | 0,003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/512 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Keterangan:

AMX : Amoksisilin

CHL : Kloramfenikol

CTX : Kotrimoksazol

Pada uji ZOI antibiotik tunggal didapatkan hasil ZOI amoksisilin, kloramfenikol dan kotrimoksazol terhadap *E.coli* dengan dosis tertinggi 0,5 mg adalah sebesar 17,3 mm, 34,6 mm dan 20,6 mm, sedangkan terhadap *S.aureus* didapatkan diameter sebesar 21,6 mm, 32,6 mm dan 25 mm (Tabel 2), ZOI hilang (<6 mm) pada pengenceran amoksisilin, kloramfenikol dan kotrimoksazol terhadap *E.coli* sebesar 1/64, 1/64 dan 1/32, sedangkan terhadap *S.aureus* pada pengenceran 1/128, 1/128 dan 1/32.

ZOI Kombinasi

Uji ZOI kombinasi antibiotik dengan meniran menggunakan 2 dosis berbeda dari tiap bahan cobanya, dosis pertama yaitu antibiotik dosis rendah (ADR) dan herbal dosis rendah (HDR) merupakan dosis yang diambil dari hasil ZOI tunggal dengan diameter <10 mm, sedangkan antibiotik dosis tinggi (ADT) dan herbal dosis tinggi (HDT) adalah 8 kali lebih tinggi dari dosis ADR dan HDR. Pada penelitian ini tidak didapatkan zona hambat herbal meniran terhadap *E.coli*, sehingga dosis yang digunakan adalah HDT adalah 2 mg/ml dan HDR adalah 1 mg/ml, ZOI kombinasi dilakukan dengan mengkombinasikan ADT dengan HDT, ADT dengan HDR, ADR dengan HDT dan ADR dengan HDR. Hasil uji ZOI kombinasi meniran dengan AMX, CHL dan CTX terhadap *E.coli* dan *S.aureus* dapat dilihat pada tabel 3 berikut ini.

Hasil uji ZOI kombinasi menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ukuran diameter dibandingkan dengan antibiotik dan herbal tunggalnya baik terhadap *E.coli* maupun *S.aureus*. Pengombinasian antara antibiotik dan meniran dapat berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Pada penelitian ini menunjukkan terjadinya peningkatan secara signifikan pada perbandingan antibiotik dosis tinggi dan herbal dosis tinggi dengan herbal dosis rendah antibiotik AMX dan CTX terhadap *E.coli*, sedangkan hal tersebut tidak terjadi pada CHL. Hasil perbandingan pengombinasian herbal dosis tinggi dan antibiotik dosis rendah dengan antibiotik dosis rendah menunjukkan hasil meingkat secara signifikan ($p < 0,05$) pada ketiga antibiotik terhadap *E.coli*. Berdasarkan penelitian ini kombinasi CHL dengan meniran terhadap *E.coli* menunjukkan rerata diameter paling besar, yang kemudian diikuti oleh CTX dan AMX.

Hasil analisa data perbandingan antibiotik dosis tinggi dan herbal dosis tinggi dengan herbal dosis rendah terhadap *S.aureus* menunjukkan peningkatan secara signifikan pada kombinasi CTX terhadap *S.aureus*, namun tidak terjadi pada AMX dan CHL. Perbandingan pengombinasian herbal dosis tinggi dan antibiotik dosis tinggi dengan antibiotik dosis rendah pada ketiga antibiotik terhadap *S.aureus*. Kombinasi CTX dengan meniran menunjukkan rerata diameter yang paling besar diikuti CHL dan AMX.

Tabel 3 Hasil Pengukuran *Zone of Inhibition* Kombinasi Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

| Dosis Kombinasi | ZOI (mm) | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | |
| | AMX n = 3 | CHL n = 3 | CTX n = 3 | M n = 3 | AMX n = 3 | CHL n = 3 | CTX n = 3 | M n = 3 |
| ADT+HDT | 15±0 ^{c,d} | 27,3±2,30 ^{c,d} | 19±0 ^{c,d} | | 14±0 | 16,3±0,58 ^d | 19±2 ^{c,d} | |
| ADT+ADR | 15,6±1,15 | 24±2 | 16,3±0,57 ^a | | 16,6±1,52 ^a | 20±0 ^a | 19,3±1,52 | |
| ADT | 12,6±1,15 ^b | 18,6±1,15 ^b | 14,3±0,57 ^b | | 14±2 | 14,6±1,15 | 15,6±2,1 | |
| HDT+HDT | | | | 0±0 | | | | 14,6±1,15 |
| HDT | | | | 0±0 | | | | 12±1,73 |
| ADR+HDR | 9±0 ^{g,h} | 8,3±0,57 ^{g,h} | 0±0 | | 6±0 ^g | 6±0 ^g | 6±0 ^g | |
| ADR+ADR | 8±0 ^c | 0±0 ^c | 0±0 | | 8±2 | 0±0 ^c | 0±0 ^c | |
| ADR | 0±0 ^f | 0±0 ^f | 0±0 | | 0±0 | 0±0 ^f | 0±0 ^f | |
| HDR+HDR | | | | 0±0 | | | | 8,6±1,15 |
| HDR | | | | 0±0 | | | | 6,3±0,57 |
| ADT+HDR | 10,6±0,57 ^{g,h} | 25±2,6 ^{g,h} | 16±1,73 ^{g,h} | | 11,3±1,15 ^b | 12,6±0,57 ^{g,h} | 15,3±1,15 ^{g,h} | |
| ADT+ADT | 15,6±1,15 ^a | 24±2 | 16,3±0,57 | | 16,6±1,52 | 20±0 ^a | 19,3±1,52 | |
| ADT | 12,6±1,15 ^b | 18,6±1,15 ^b | 14,3±0,57 | | 14±2 | 14,6±1,15 ^b | 15,6±2,1 | |
| HDR+HDR | | | | 0±0 | | | | 8,6±1,15 |
| HDR | | | | 0±0 | | | | 6,3±0,57 |
| ADR+HDT | 13±1 ^{c,d} | 12,3±1,15 ^{c,d} | 11±0 ^{c,d} | | 8±0 ^{c,d} | 8,6±1,15 ^{c,d} | 9,6±0,57 ^{c,d} | |
| ADR+ADR | 8±0 ^e | 0±0 ^e | 0±0 ^e | | 8±2 | 0±0 ^e | 0±0 ^e | |
| ADR | 0±0 ^f | 0±0 ^f | 0±0 ^f | | 0±0 ^f | 0±0 ^f | 0±0 ^f | |
| HDT+HDT | | | | 0±0 | | | | 14,6±1,15 |
| HDT | | | | 0±0 | | | | 12±1,73 |

Keterangan: AMX = *Amoxicillin*; CHL = *Chloramphenicol*; CTX = *Co-trimoxazol*; M = Meniran; ADT = Antibiotik Dosis Tinggi; ADT untuk AMX (*E.coli*=0,125 mg/ml, *S.aureus*=0,06 mg/ml); ADT untuk CHL (*E.coli*=0,06 mg/ml, *S.aureus*=0,03 mg/ml); ADT untuk CTX (*E.coli*=0,125 mg/ml, *S.aureus*=0,125 mg/ml); ADR = Antibiotik Dosis Rendah; ADR untuk AMX (*E.coli*=0,01 mg/ml, *S.aureus*=0,007 mg/ml); ADR untuk CHL (*E.coli*=0,01 mg/ml, *S.aureus*=0,007 mg/ml); ADR untuk CTX (*E.coli*=0,03 mg/ml, *S.aureus*=0,03 mg/ml); HDT = Herbal Dosis Tinggi (*E.coli*=2 mg/ml, *S.aureus*=0,5 mg/ml); HDR = Herbal Dosis Rendah (*E.coli*=1 mg/ml, *S.aureus*=0,25 mg/ml); a. Pengombinasian berbeda signifikan dengan ADT+ADT; b. Pengombinasian berbeda signifikan dengan ADT; c. Pengombinasian berbeda signifikan dengan HDT+HDT; d. Pengombinasian berbeda signifikan dengan HDT; e. Pengombinasian berbeda signifikan dengan ADR+ADR; f. Pengombinasian berbeda signifikan dengan ADR; g. Pengombinasian berbeda signifikan dengan HDR+HDR; h. Pengombinasian berbeda signifikan dengan HDR.

Hasil Kadar Hambat Minimum (KHM) Tunggal

Uji KHM antibiotik amoksisilin, kloramfenikol dan kotrimoksazol secara tunggal terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dalam beberapa pengenceran. Penentuan hasil KHM antibiotik tunggal yaitu 20-50% dari

kontrol positif dalam setiap ujunya¹⁹. Hasil KHM amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *E.coli* didapatkan pada dosis 0,007 mg/ml. Hasil KHM kotrimoksazol terhadap *E.coli* yaitu pada dosis 9×10^{-5} mg/ml (Tabel5).

Hasil KHM amoksisilin terhadap *S.aureus* pada dosis sebesar 0,007 mg/ml. Hasil KHM

kloramfenikol dan kotrimoksazol terhadap *S.aureus* didapatkan pada dosis 0,03 mg/ml. Hasil KHM tunggal dapat dilihat pada tabel 4. Analisis hasil KHM antibiotik tunggal dilakukan menggunakan Spektrofotometer EPOCH dengan program GEN 5™.

Hasil pengukuran KHM meniran tunggal terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ditemukan dalam dosis yang berbeda. Hasil KHM meniran terhadap *E.coli* terdapat pada dosis 0,06 mg/ml, sedangkan KHM meniran terhadap *S.aureus* terdapat pada dosis 0,003 mg/ml. Hasil dari KHM meniran dievaluasi secara visual dengan melihat kejernihan atau ada tidaknya endapan pada dasar tabung, namun evaluasi KHM terhadap meniran secara tunggal sulit dilakukan, karena ekstrak meniran sendiri memiliki warna hijau gelap. Sehingga disarankan untuk menggunakan metode yang dapat mempermudah evaluasi KHM dengan bahan coba yang memiliki zat warna pekat.

Hasil Kadar Hambat Minimum (KHM) Kombinasi Antibiotik dan Meniran

Hasil KHM kombinasi pada tabel 4 menunjukkan bahwa kombinasi meniran dengan AMX terhadap *E.coli* mengalami peningkatan dibandingkan dengan antibiotik maupun meniran secara tunggal. Sebelumnya penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan terjadi pada kombinasi meniran dengan CTX terhadap *E.coli* dan tidak terjadinya perubahan dari hasil KHM pada kombinasi meniran dengan CHL terhadap *E.coli*.

Hasil diatas berbeda pada *S.aureus*, yang mana kombinasi AMX dengan meniran mengalami penurunan menjadi 1/512 dibandingkan antibiotik tunggal maupun meniran tunggal. Begitu pula pada kombinasi meniran dengan CHL terhadap *S.aureus*. Selain itu, penelitian ini juga menunjukkan bahwa kombinasi meniran dengan CTX terhadap *S.aureus* tidak mengalami perubahan dosis dibandingkan uji tunggalnya.

Hasil KHM tunggal maupun kombinasi yang telah dievaluasi dapat dilakukan perhitungan nilai *Fractional Inhibitory Concentration* (FIC) dengan metode *Checkerboard assay* untuk melihat sifat dari interaksi tiap kombinasi (Tabel 5). Hasil perhitungan FIC dari tiap kombinasi memberikan hasil yang berbeda-beda. Kombinasi meniran dengan AMX terhadap *E.coli* bersifat antagonis, Hasil FIC indeks kombinasi CHL dan CTX dengan meniran terhadap *E.coli* bersifat aditif.

Hasil FIC indeks kombinasi AMX dengan meniran terhadap *S.aureus* berinteraksi secara sinergis, sedangkan hasil FIC indeks kombinasi CHL dan CTX dengan meniran terhadap *S.aureus* menunjukkan interaksi yang aditif.

Hasil Kadar Bunuh Minimum (KBM) Antibiotik dan Meniran Tunggal

Hasil KBM tunggal pada tabel 5 menunjukkan bahwa dibutuhkan dosis lebih besar untuk membunuh bakteri dibandingkan dengan menghambatnya, sehingga dosis KBM lebih besar dibandingkan dengan dosis KHM. Hasil KBM menunjukkan semakin kecil dosis KBM, maka semakin efektif bahan coba dalam membunuh bakteri²⁰. Dalam penelitian ini dosis terendah dalam membunuh KBM terdapat pada antibiotik *chloramphenicol* terhadap *E.coli* sebesar 0,01 mg/ml (1/64) dan *amoxicillin* terhadap *S.aureus* sebesar 0,03 mg/ml (1/32). Selain itu, CTX terhadap *E.coli* memiliki hasil KBM yang sama dengan CHL dan CTX terhadap *S.aureus* dengan dosis sebesar 0,06 mg/ml (1/16), dan antibiotik dengan dosis KBM yang terbesar terdapat pada AMX terhadap *E.coli*, Hasil KBM tunggal meniran terdapat pada dosis 0,003 mg/ml (1/256).

Hasil Kadar Bunuh Minimum (KBM) Kombinasi

Data KBM kombinasi yang diukur dengan melihat ada tidaknya koloni bakteri dari tiap konsentrasi menunjukkan beberapa kombinasi seperti AMX dan CTX dengan meniran terhadap *E.coli* dan kombinasi CHL dengan meniran terhadap *S.aureus* tidak dapat diinterpretasikan dalam FBC indeks karena memiliki hasil KBM diluar dari dosis yang diuji.

Hasil kombinasi AMX dengan meniran terhadap *S.aureus* mengalami penurunan konsentrasi pada KBM dibandingkan antibiotik tunggalnya, namun tidak berbeda dengan dosis meniran. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa kombinasi antibiotik dengan meniran dapat menurunkan konsentrasi keduanya, antara lain kombinasi AMX dan CTX dengan meniran terhadap *S.aureus*, dimana terjadi penurunan sebesar 16x dibandingkan antibiotik tunggal.

Hasil KBM kombinasi yang telah dievaluasi kemudian dimasukkan kedalam perhitungan nilai *Fractional Bactericidal Concentration* (FBC) dengan metode *Checkerboard assay* untuk menilai sifat dari tiap interaksi. Data FBC indeks berdasarkan tabel 5 memperlihatkan kombinasi AMX dan CTX dengan meniran terhadap *S.aureus* berinteraksi secara sinergis, hal tersebut dilihat dari total nilai FBC <0,5. Hasil perhitungan FBC kombinasi CHL dengan meniran terhadap *E.coli* berinteraksi secara indifference karena bernilai 1,3, yang mana dikatakan aditif apabila hasil FBC bernilai 0,5–4 (Tabel 5).

PEMBAHASAN

Uji ZOI, KHM dan KBM Antibiotik Tunggal dan Meniran terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Hasil uji ZOI dari ekstrak meniran terhadap *E.coli* dengan konsentrasi induk 2 mg/ml tidak menunjukkan adanya zona bening yang mengelilingi sumuran. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Ibrahim *et al* (2013), uji dilakukan menggunakan ekstrak metanol meniran dengan konsentrasi 100 mg/ml, dengan hambatan terhadap *E.coli* sebesar 8 mm¹¹. Dari penelitian di atas dapat dilihat bahwa dengan konsentrasi 100 mg/ml meniran hanya dapat menghambat sampai 8 mm *E.coli*. Namun, hasil uji ZOI meniran tunggal terhadap *E.coli* tidak didukung dengan hasil uji KHM meniran tunggalnya. Hasil KHM meniran terhadap *E.coli* menunjukkan hambatan terjadi pada dosis 0,06 mg/ml (1/16). Sehingga hasil tersebut menunjukkan jika ekstrak meniran dapat lemah terhadap *E.coli*, tetapi penghambatannya tergolong kuat.

Hasil ZOI ekstrak meniran terhadap *S.aureus* menunjukkan adanya zona bening yang terbentuk dengan dosis 1 mg/ml sebesar 20,3 mm, sehingga diketahui bahwa meniran mampu menghambat secara kuat *S.aureus*. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Ibrahim *et al* (2013), yang mana 100 mg/ml ekstrak metanol meniran terhadap *S.aureus* memberikan efek antibakteri sebesar 15 mm¹¹. Hasil ini menunjukkan jika penelitian yang dilakukan memberikan hasil yang lebih baik dari penelitian sebelumnya. Perbedaan hasil ZOI meniran terhadap *S.aureus* di atas dapat terjadi karena penelitian dilakukan pada negara yang berbeda, sehingga meniran tumbuh pada tanah dan perawatan yang berbeda dan hal tersebut dapat mempengaruhi kondisi dari tanaman²¹. Selain itu aktifitas antibakteri yang diperlihatkan meniran karena senyawa aktif didalam meniran seperti *quercetin*, *rutin*, *isoquercitrin*, *corilagin*, *ellagic acid*, hinokinin bekerja langsung pada dinding sel bakteri yang akan membuat bakteri lisis²².

Hasil ZOI meniran tunggal terhadap *S.aureus* menunjukkan jika meniran cukup efektif dalam menghambat bakteri, hal ini juga didukung dengan hasil uji KHM meniran tunggal pada *S.aureus* dengan dosis terkecil sebesar 9×10^{-5} mg/ml (1/1024). Perbedaan hasil KHM pada meniran terhadap kedua bakteri ini dapat terjadi karena kandungan dari dinding sel kedua bakteri berbeda, *E.coli* memiliki susunan dinding yang lebih kompleks karena memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan *S.aureus*, sehingga meniran dengan senyawa aktif terbanyak bekerja didinding sel akan lebih efektif dalam menghambat *S.aureus*^{23,24}.

Hasil KBM biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan hasil KHM, karena senyawa akan lebih mudah bekerja untuk menghambat bakteri dibandingkan dengan

membinuhkannya²⁵. Pada penelitian ini hasil KBM herbal tunggal terhadap *E.coli* sebesar 0,25 mg/ml dan terhadap *S.aureus* sebesar 0,003 mg/ml. Hal ini menunjukkan jika ekstrak metanol meniran bekerja secara bakterisidal pada kedua bakteri, karena suatu senyawa dikatakan bakterisidal apabila memiliki hasil KBM tidak lebih besar 4 kali dari uji tunggalnya²⁵.

Hasil uji ZOI antibiotik pada penelitian ini menunjukkan hasil yang resisten dan KHM dari antibiotik tunggal terhadap kedua bakteri ada yang menunjukkan aktifitas sensitif dan hanya sebatas menghambat. Hasil ini merujuk pada *guideline* yang diatur dalam *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)²⁶. Hal ini diduga terjadi karena pada penelitian ini tidak menggunakan antibiotik murni, sehingga aktivitasnya berbeda dengan CLSI yang menggunakan antibiotik *pure compound*.

Hasil KBM AMX terhadap *E.coli* terdapat pada dosis 0,125 mg/ml, CHL pada dosis 0,01 mg/ml dan CTX ada pada dosis 0,06 mg/ml. Hasil KBM pada penelitian ini menunjukkan jika AMX bekerja secara bakterisidal terhadap *E.coli*, sedangkan CHL dan CTX bekerja secara bakteriostatik. Dikatakan bakterisidal karena hasil dari KBM AMX tunggal tidak lebih dari 4x hasil KHM nya dan dua antibiotik lainnya bersifat bakteriostatik karena memiliki hasil KBM lebih dari 4x hasil KHM nya.

Hasil KBM AMX terhadap *S.aureus* ada pada dosis 0,03 mg/ml dan KBM CHL dan CTX ada pada 0,06 mg/ml. Hasil di atas menunjukkan bahwa ketiga antibiotik bekerja secara bakterisidal terhadap *S.aureus* karena memiliki hasil KBM yang tidak lebih dari 4x dosis KHM nya. Sehingga, dapat dikatakan jika ketiga antibiotik ini efektif dalam membunuh bakteri *S.aureus*.

Uji ZOI, KHM dan KBM Kombinasi Antibiotik dengan Meniran terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Hasil uji ZOI kombinasi antibiotik dengan meniran menunjukkan interaksi yang berbeda dengan hasil yang didapat pada pengujian KHM dan KBM kombinasi. Kombinasi ketiga antibiotik dengan meniran terhadap *E.coli* dalam uji ZOI kombinasi memberikan hasil yang sinergis.

Namun hasil ZOI kombinasi di atas tidak seluruhnya sesuai dengan hasil penelitian pada KHM kombinasi. Pada hasil uji ZOI, kombinasi meniran dengan AMX terhadap *E.coli* bernilai sinergis. Tetapi berbeda dengan KHM kombinasi AMX dan meniran yang mengalami peningkatan pada dosis, sehingga memberikan efek antagonis dalam menghambat bakteri. Diduga, kondisi di atas terjadi karena kedua uji menggunakan jenis media yang berbeda yaitu cair dan padat, sehingga proses difusi dari bahan coba akan berbeda dan hal tersebut akan mempengaruhi efektifitasnya²⁷. Selain itu, perbedaan jenis media ini memberikan lingkungan yang berbeda untuk bakteri. Sehingga, perbedaan dari lingkungan pada bakteri akan

berakibat bakteri menunjukkan respon yang berbeda-beda²⁸. Hasil KHM kombinasi CHL dan CTX dengan meniran terhadap *E.coli* menghasilkan interaksi yang aditif, hasil ini berdasarkan perhitungan FIC indeks dari kombinasi tersebut.

Hasil uji ZOI kombinasi AMX dengan meniran terhadap *S.aureus* menunjukkan hasil yang aditif namun, hasil ZOI kombinasi AMX tidak didukung dengan hasil KHM kombinasinya yang bernilai sinergis. Kombinasi tersebut bernilai sinergis diduga karena, *amoxicillin* merupakan antibiotik yang bekerja aktif pada dinding sel bakteri dengan membentuk ikatan cincin β -lactam yang akan menginaktivasi *Penicillin Binding Protein* (PBP) pada dinding sel bakteri. Inaktivasi dari PBP akan mengganggu rantai polimer peptidoglikan linear yang digunakan untuk membentuk komponen mayor dan minor pada dinding sel bakteri, sehingga akan menyebabkan bakteri mudah lisis²⁹. Selain itu, aktivitas antibiotik diduga dibantu oleh meniran yang bekerja di beberapa tempat, yaitu senyawa quercitrin, rutin, isoquercitrin dan corilagin bekerja merusak dan menghambat PBP pada dinding dan membran sel bakteri^{30,31}. Selain itu *gallic acid* dari meniran bekerja dengan menghambat DNA gyrase pada bakteri, sehingga aktifitas tersebut yang membantu meningkatkan kinerja antibiotik dan akan menghasilkan nilai yang sinergis³².

Kombinasi meniran dengan CHL dan dengan CTX pada ZOI memiliki aktivitas yang aditif, Berdasarkan KHM, nilai FICI kombinasi tersebut bernilai aditif karena memiliki nilai diantara 0,5–4. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Ocampo *et al* (2014) mengenai kerja kombinasi dari 2 antibiotik yang bekerja secara bakteristatik dan bakterisidal, yang mana bekerja pada ribosom dan dinding sel, Hasil tersebut menunjukkan jika kombinasi tersebut tidak memberikan hasil yang lebih baik apabila dikombinasikan³³. Namun, pada penelitian ini dalam uji ZOI memberikan hasil sinergis pada antibiotik dengan kerja yang berbeda, Sehingga perbedaan yang terjadi pada hasil dari beberapa penelitian yang berbeda masih belum diketahui dan belum jelas mekanismenya.

Hasil KBM kombinasi meniran dengan CHL terhadap *E.coli* bekerja secara bakterisidal, hasil ini memperkuat aktivitas bakterisidal dibandingkan dengan uji tunggalnya, namun tidak dapat dievaluasi pada antibiotik lain karena KBM di luar dari dosis uji. Sedangkan pada *S.aureus* kombinasi AMX dan CHL dengan meniran memperkuat aktivitas bakterisidalnya dibandingkan dengan uji tunggalnya, dan tidak dapat dievaluasi pada kombinasi AMX dengan meniran terhadap *S.aureus*.

KESIMPULAN

Kombinasi AMX, CHL dan CTX dengan meniran terhadap kedua bakteri dalam uji ZOI meningkatkan daya hambat yang lebih kuat dibandingkan dengan uji tunggalnya. Sedangkan, kombinasi ketiga antibiotik dengan meniran

terhadap *S.aureus* dalam uji ZOI menunjukkan hasil yang aditif.

Kombinasi CHL dan CTX dengan meniran terhadap kedua bakteri dalam uji KHM memberikan hasil yang aditif. Sedangkan kombinasi AMX dengan meniran terhadap *E.coli* dan *S.aureus* memberikan hasil yang berbanding terbalik, dimana kombinasi terhadap *E.coli* bersifat antagonis dan terhadap *S.aureus* bersifat sinergis.

Kombinasi CHL dengan meniran terhadap *E.coli* dalam uji KBM kombinasi bersifat aditif, sedangkan untuk AMX dan CTX tidak dapat dievaluasi. Untuk hasil KBM pada kombinasi AMX dan CTX dengan meniran memberikan hasil yang sinergis, sedangkan pada CHL tidak dapat dievaluasi.

SARAN

Adapun saran untuk meningkatkan dan mengembangkan penelitian ini lebih lanjut adalah:

1. Melakukan identifikasi senyawa fitokimia Meniran (*Phyllanthus niruri*).
2. Melakukan pemisahan senyawa fitokimia Meniran (*Phyllanthus niruri*).
3. Melakukan uji ZOI, KHM dan KBM pada setiap senyawa fitokimia yang telah didapatkan.
4. Melakukan uji KHM herbal dengan warna pekat menggunakan metode yang lebih mudah.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Guidelines on Core Components of Infection Prevention and Control Programmes at the National and Acute Health Care Facility Level. WHO Document Production Services, Geneva: Switzerland. 2016.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Pelayanan Kefarmasian Untuk Terapi Antibiotik. Jakarta. 2011.
3. Katzung B, G. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th ed. Boston: McGraw Hill, 2007.
4. World Health Organization. Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis. 4th Ed. Switzerland. 2009
5. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 2015 Tentang Program Pengendalian Resistensi Antimikroba di Rumah Sakit. Jakarta. 2015.
6. Imaniah B, A. Peta Kuman dan Resistensinya terhadap Antibiotik pada Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2014. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2015.
7. AMRIN study group. Antimicrobial Resistance. Antibiotic Usage and Infection Control. Jakarta:

- Directorate General of Medical Care Ministry of Health Republic of Indonesia. 2005.
8. Ahmed Z., Saeed SK., Khan M. In vitro trials of some antimicrobial combinations against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. National Center for Biotechnology Information. United State. 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730708/>
 9. Yu A., C., Loo J., F., Kong S.K., Chan T., F. Monitoring Bacterial Growth Using Tunable Resistive Pulse Sensing With a Pore-based Technique. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2): 855-62. 2005.
 10. Rivai H., Nurudin H., Suyani H., & Bakhtiar A. Pengaruh Cara Pengeringan Terhadap Mutu Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L). Padang. 2011.
 11. Ibrahim D., Hong LS and Kuppam N. Antimicrobial Activity of Crude Methanolic Extract from *Phyllanthus niruri*. Industrial Biotechnology Research Laboratory (IBRL). School of Biological Sciences. Universiti Sains Malaysia. 2013.
 12. Taylor L. Technical data report for chanca pedra "stone breaker" (*Phyllanthus niruri* L). 2003. <http://www.rain-tree.com/chanca-techreport.pdf>.
 13. Reynolds J., College R. Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility. 2011.
 14. Ziaei-Daroukalei N., Ameri M., Zhraei-Salehi T et al. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. National Center for Biotechnology Information. USA. 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929268/>
 15. Mulyadi M., Wuryanti and Sarjono PR. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. Universitas Diponegoro. Semarang. 2017.
 16. Hallander HO., Dornbusch K., Gezelius L et al. Synergism between Aminoglycosides and Cephalosporins with Antipseudomonal Activity: Interaction Index and Killing Curve Method. National Bacteriological Laboratory. Sweden. 1982.
 17. Daroukalei Z, N., Ameri M., Salehi Z, T., Daroukalei Z, O., Tabrizi M, T., Bornaei L, AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. National Center for Biotechnology Information. 2016.
 18. Tripathi KD. *Essentials of Medical Pharmacology* 7th ed, India: Jaypee Brothers Medical Publisher. New Delhi. 2013.
 19. The CH., Nazni WA., Nurulhusna AH et al. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BioMed Central Microbiology*. 2017.
 20. Amyes S et al. *Antimicrobial Chemotherapy: Pocketbook*. CRC Press. 1996.
 21. Swastini., Ayu D dkk. *Buku Ajar Farmakognosia*. Universitas Udayana. Bukit Jimbaran. 2007.
 22. Calixto J, B., Santos A, R, S., Filbo V, C., Yunes R, A. A Review of the Plants of the Genus *Phyllanthus*: Their Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential. Department of Pharmacology. CCB. 1998.
 23. Coyle MB. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology. 2005.
 24. Romaniuk JAH and Cegelski L. Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR. *Philosophical Transactions B. National Center for Biotechnology Information*. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632600/>
 25. Goins M. Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Bactericidal concentration (MBC) Evaluation AS R&D Tools. 2017.
 26. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 26th Ed. USA. 2016.
 27. Cheung AL., Fieschetti VA., Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. NCBI. 1988.
 28. Huang KC., Mukhopadhyay R., Wen B et al. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. University of Maryland. 2008.
 29. National Center for Biotechnology Information. Amoxicillin. National Library of Medicine. USA. 2018. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amoxicillin>
 30. Wu T., He W., Zang X et al. A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Elsevier. 2013.
 31. Shiota S., Simizu M., Sugiyama J et al. Mechanisms of action corilagin and tellinagrindin I that remarkably potentiate the activity of Beta lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Shujitsu University. 2003.
 32. Weider-Wells MA., Altom J., Fernandez J et al. DNA gyrase inhibitory activity of ellagic acid derivatives. PubMed. National Center for Biotechnology Information. 1998.
 33. Ocampo PS., Lazar V., Papp B et al. Antagonism between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics Is Prevalent. American Society for Microbiology. 2014.

label 4: Hasil Pengukuran KHM dan KBM secara Tunggal dan Kombinasi terhadap *Ecdi* dan *S aureus*

| Bakteri | Dosis (mg/ml) | Dilusi | KHM Tunggal | | | | KBM Tunggal | | | | KHM Kombinasi | | | KBM Kombinasi | | |
|-----------------|--------------------|--------|-------------|-----|-----|----|-------------|-----|-----|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | AMK | CHL | CIM | M | AMK | CHL | CIM | M | AMK ⁺ _M | CHL ⁺ _M | CIM ⁺ _M | AMK ⁺ _M | CHL ⁺ _M | CIM ⁺ _M |
| <i>Ecdi</i> | 0.5 | 1/2 | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | |
| | 0.25 | 1/4 | - | - | - | -* | - | - | - | - | | | | | | |
| | 0.125 | 1/8 | - | - | - | - | - | - | - | + | | | | | | |
| | 0.06 | 1/16 | - | - | - | - | + | - | - | + | | | | | | |
| | 0.03 | 1/32 | - | - | - | + | + | - | + | + | | | | | | |
| | 0.01 | 1/64 | - | - | - | + | + | - | + | + | -* | -* | | + | -* | |
| | 0.001 | 1/128 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | | + | - | |
| | 0.0005 | 1/256 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | -* | + | + | + |
| | 0.0001 | 1/512 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| | 9x10 ⁻⁵ | 1/1024 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| | 4x10 ⁻⁵ | 1/2048 | + | + | + | + | + | + | + | + | | | + | | | + |
| | 2x10 ⁻⁵ | 1/4096 | + | + | + | + | + | + | + | + | | | + | | | + |
| <i>S aureus</i> | 0.5 | 1/2 | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | |
| | 0.25 | 1/4 | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | |
| | 0.125 | 1/8 | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | | |
| | 0.06 | 1/16 | - | - | - | - | - | - | - | - | | • | • | | • | • |
| | 0.03 | 1/32 | - | - | - | - | - | + | + | - | • | - | - | • | + | - |
| | 0.01 | 1/64 | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | - |
| | 0.001 | 1/128 | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + |
| | 0.0005 | 1/256 | + | + | + | • | + | + | + | - | - | + | + | - | + | + |
| | 0.0001 | 1/512 | + | + | + | - | + | + | + | + | - | | | + | | |
| | 9x10 ⁻⁵ | 1/1024 | + | + | + | - | + | + | + | + | | | | | | |
| | 4x10 ⁻⁵ | 1/2048 | + | + | + | - | + | + | + | + | | | | | | |
| | 2x10 ⁻⁵ | 1/4096 | + | + | + | - | + | + | + | + | | | | | | |

Keterangan

AMK : Ampicillin
CHL : Chloramphenicol
CIM : Cotrimoxazole
M : Miniran

KHM : Kadar Hambat Minimum

KBM : Kadar Bunuh Minimum

• : Dosis tertinggi dalam kombinasi terhadap *S aureus*

* : Dosis tertinggi dalam kombinasi terhadap *Ecdi*

• : Hasil KHM dan KBM

Label 3, Hasil Perhitungan FICI dan FBC Indeks Kombinasi Antibiotik dengan Miniran

| Bakteri | HC(M) | $\frac{1}{AMK}$ | $\sum FICI$ | Sifat | HC(M) | $\frac{1}{CH}$ | $\sum FICI$ | Sifat | $\frac{1}{M}$ | $\frac{1}{CIX}$ | $\sum FBCI$ | Sifat |
|-----------------|--------|-------------------|-------------|-----------|--------|------------------|-------------|--------|---------------|-------------------|-------------|----------|
| <i>Ecoli</i> | 4,2 | 3 | 1,2 | Antagonis | 1 | 0,13 | 1,13 | Aditif | 0,5 | 1 | 1,5 | Aditif |
| <i>S aureus</i> | 0,22 | 0,14 | 0,36 | Sinergis | 0,44 | 0,7 | 1,14 | Aditif | 1 | 1 | 2 | Aditif |
| | FBC(M) | $\frac{FBC}{AMK}$ | $\sum FBCI$ | Sifat | FBC(M) | $\frac{FBC}{CH}$ | $\sum FBCI$ | Sifat | FBC(M) | $\frac{FBC}{CIX}$ | $\sum FBCI$ | Sifat |
| <i>Ecoli</i> | 10 | 10 | 10 | ID | 1 | 0,3 | 1,3 | Aditif | 10 | 10 | 10 | ID |
| <i>S aureus</i> | 0,3 | 0,0 | 0,3 | Sinergis | 10 | 10 | 10 | | 0,3 | 0,0 | 0,3 | Sinergis |

Keterangan

AMK : Ampicillin
CH : Chloramphenicol
CIX : Cotrimoxazole
M : Miniran

HC : Fractional Inhibitory Concentration
FBC : Fractional Bactericidal Concentration
FICI : Fractional Inhibitory Concentration Index
FBCI : Fractional Bactericidal Concentration Index

ID : Tidak Dukung

Label 3 diatas FICI dan FBCI dari CHL dan CIX diketahui bahwa penghitungan yang interaksi dari kombinasi membunuh bakteri menggunakan rumus pada bab metode. Diketahui jika perbandingan menunjukkan resistensi diketahui karena antibiotik dengan perlu dikombinasikan apabila memiliki pengkombinasi, kedua bakteri berbeda. Pada kombinasi memberikan antagonis, menghasilkan resistensi dikatakan sinergis sedangkan jika memberikan nilai pada penghitungan. Hasil FBCI pada dengan AMX, menunjukkan resistensi Interaksi yang pengkombinasi dengan CIX tidak dapat dilakukan karena berada diluar dosis miniran, dengan memberikan respon. *S.aureus* tidak dapat kemungkinan ber-

